CHROMATOGRAPHIE
GENERALITES

Section 2 titles [illegible] 5

Introduction

Ø **Historique**

- 1903 : Tswett sépare des pigments végétaux (chlorophylles) sur une colonne remplie de $CaCO_3$ (phase stationnaire) + solvant (phase mobile)
- Observation → les composés se séparent en pls zones colorées parce qu'∃ des interactions ≠tes avec la PS(phase stationnaire) et la PM (phase mobile).

1 Définitions

- chromatographie =
  - Techniques de séparation des constituants d'un mélange homogène qui est basée sur un processus de migration différentielle, où les analytes se répartissent en 2 phases, l'une mobile par rapport à l'autre (φs et φm).

- Chromatogramme =
  - signal enregistré en fct° du volume d'élution

- phase stationnaire(φs) = phase qui reste en place ds une colonne ou sur une plaque

- phase mobile(φm) = phase qui se déplace sur ou à travers la φs elle entraîne les constituants à analyser

- éluat =solution recueillit à la sortie de la colonne la chromato permet l'identification et le d osage des substances

- élution = processus au cours duquel on sépare les phases

2 Classification

2.1 Suivant la nature des phases

- chromato en phase liq : PM=liq
  - PS=solide (LS)
  - PS=liquide (LL)
  - PS=résine échangese d'ion
  - PS=Gel

- chromato en phase gazeuse : PM=gaz
  - PS=solide (GS)
  - PS=liquide (GL)

2.2 Suivant le mécanisme d'échange

- Coefficient de distribution Kd du soluté entre φs et φm :

  Kd =Cs/Cm = conc du soluté ds φs/conc ds φm

  c'est parce que les Kd sont ≠ que les substances se séparent

- Chromatographie :
  - d'absorption (L/S)
  - de partage (L/L)
  - d'échange d'ion
  - d'appariement d'ion
  - exclusion diffusion ou exclusion stérique

2.3 Suivant le procédé utilisé

- Selon la présentation de la PS :
  - Colonne : CPG, HPLC,
  - Planaire : φs de faible épaisseur ,gde surface → papier ou couche mince (CCM)

- Selon les modalités de migration de la φm :
  - chromato d'élution :

  → on poursuit l'élution jusqu'à ce que les solutés soient entraînés en dehors de la φs
  - développement :

  → l'élution des substances est telle que les substances demeurent sur φs et sont localisées sur φs

3 Théorie de base de la chromatographie

Fig 5

3.1 Théorie des plateaux

- On assimile la colonne chromato à une colonne à distiller de longueur L
- Cette colonne est constituée de qlq plateaux fictifs appelés plateaux théoriques
- Une colonne est constituée de N plateaux théoriques (de même hauteur)
- La taille des plateaux, H, est appellée Hauteur équivalente à 1 plateau théorique (HEPT)

HEPT = L/N (1)

- Chaque plateau contient 1/Neme de la PM et de la PS
- Ds chaque plateau, il y aurait un eq parfait Kd vs [soluté] ds φs et φm

Kd = Cs/Cm

64 mg ds colonne

T1 plateau 2 plateau 3 plateau 4

T2 → 32 ds φs 32 ds φm

T3 → 16 ds φs 16 ds φm

→ 8 ds φs 8 ds φm….

→ pic de forme gaussienne

au départ, le soluté se partage ds le 1er plateau entre φs et φm en fct° de Kd

chaque plateau est un compartiment fictif ds lequel on considère qu'il y a eq entre φm et φs

au 2ème eq ,puisque la φm circule en continu ,l'eq est rompu

φm qui contenait le soluté descend vers 2ème plateau ,se fixe sur φs en respectant le partage de Kd

2 substances qui ont des Kd identiques, se répartissent différemment

à chaque étape correspond un nouvel eq → **séparation**

+ ∃ d'eq
+ ∃ de plateau } meilleure sera la séparation

rés

cette théorie est insuffisante car

la théorie de forme gaussienne → pic

elle ne tient pas compte de la vitesse φm/φs

3.2 Théorie cinétique

dispersion des pics ds la colonne

→ phénomène de diffusion

dispersion en fct° de la vitesse de la φm

les pics s'établissent à

Eq de mesure qu'ils descendent ds la colonne

Étendu par Van Deemter pour CPG,

Knox à la CLHP

HEPT = A + B/u + C*u (CPG) (2)

H HEPT = $A\nu^{1/3} + B/\nu + C*\nu$ (HPLC)
H = L/N = longueur équivalente à 1 plateau théorique / hauteur d'un plateau
+

cette équation montre que l'efficacité (N de plateaux) + la hauteur H est faible … des pics est liée à l'écoulement de la

u φm

A vitesse d'écoulement de φm = L/To

Effet de remplissage (diffusion turbulente) : terme de …
+ effet de diffusion latérale (dispersion de flux Eddy)
les φ et … étant constituées de grains irrégulier ,le remplissage sera irrégulier
minimisé en utilisant des particules de formes régulières ≠ et ayant ttes la même taille (rare)
diffusion latérale

B :les solutés vont d'un chemin de flux à l'autre

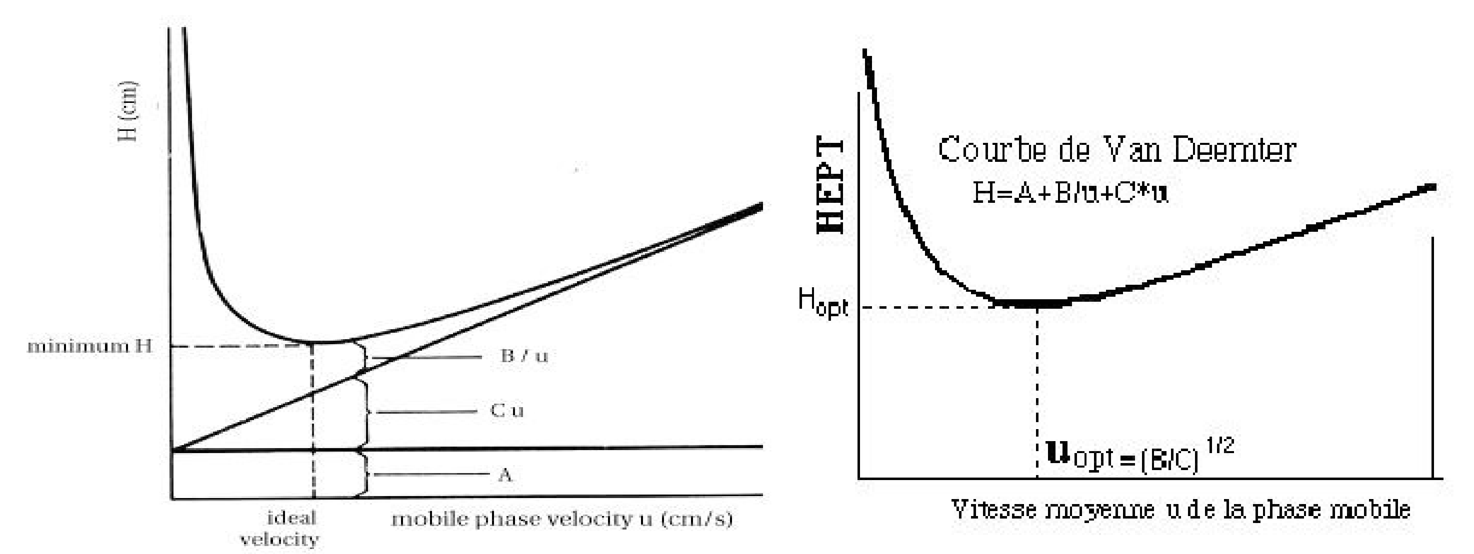
= terme de diffusion longitudinale
Dm 2γDm
Etalement du m* de soluté ds la φm / coefficient de diffusion du soluté ds la m* de soluté ds φm
Dm est + importante en CPG qu'en CPL φm même si ∃ pas d'influence externe

γ : facteur de tortuosité lié à la granulométrie et à la régularité du remplissage
C

Inégalité de transfert de masse / terme de … de m* de soluté d'une phase ds l'autre
Grain de
Diffusion selon pénétration ds les pores de φ m* φm stagnante
vitesse ≠ tes

à Les termes A B et C expliquent que les pics soient + larges / l'élargissement des pics / la vitesse de
φm

à H = f(u) représentation graphique → hyperbole (dispersion)
si H élevé pic large – Au minimum H, l'efficacité de la colonne est maximale.
Uo : débit pour lequel les pics sont les + étroits possible



4 Chromatogramme – grandeurs caratéristiques

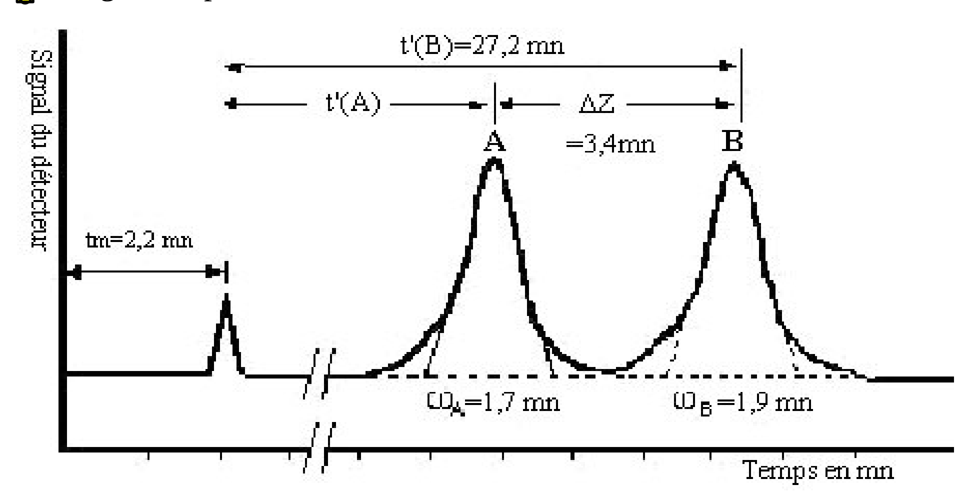
Fig 3 & 4

- Si détecteur à la sortie de la colonne, on peut enregistrer le signal en fct° du tps :
  - signaux =pics
  - l'ensemble=chromatogramme

- Les pics ont une forme, dans le cas idéal, gaussienne (4)
- La substance éluée est localisée ds une tranche faible de la colonne avec une valeur Yo

situés à 60.7% 2 pts d'inflexion E et F
caractérisés par de 2 la hauteur du pic
largeur σ =distance entre E et F (écart type)
largeur: δ=2.35σ
à la base: ω=4σ

- On caractérise un chromatogramme par certains paramètres impt :
  - T_0 = temps mort
  - Tr = temps de rétention
  - h = Hauteur du pic
  - ω = Largeur du pic (intersection des tangentes des pt d'inflexion et des abscisses)
  - δ = largeur du pic à mi-hauteur



4.1 Grandeurs caractéristiques

Tr / Vr : tps de rétention
K' : volume de rétention
Tr brut : facteur de capacité , de rétention

: tps écoulé depuis l'injection du composé ds la colonne et le max du pic chromatographique (min. ; sec. ;10ème de sec ;100ème de sec.)

To / Tr' : Tps mort =tps que mettrait un composé non retenu pour arriver au détecteur
tps de rétention corrigé ou réduit

Vr brut : volume de φm qu'il faut faire passer ds la colonne pour amener le pic à sa conc max ds le détecteur K'

K' facteur de capacité, de rétention
K' = (Tr1 –To)/To = tps de rétention réduit /to
↔ rapport molaire entre qtité de soluté ds la φs et ds la φm
K' ↔ tps passé par le soluté ds φs / tps ds φm
En CLHP doit être compris entre 1 et 10
Dpd du couple φs/φm ,de la T° (action sur la viscosité φm)
En CPG doit être compris entre 1 et 20
dpd de la nature de la φs
K' ne dpd pas

Du : de la longueur de la colonne
débit de la φm

4.2 Facteur de séparations ou de sélectivité α

mesure de la sélectivité de 1 à 2 (cela ne suffit pas pour savoir si séparation finale possible) ; les potentiel à séparer 2 composés

relié à la sélectivité de 1 à 2 : α1 2 = (Tr2-To)/(Tr1-To) = K'2/K'1

+ les pics sont séparés ,+ α est grand, écartement au sommet des 2 pics
2 colonnes qui présentent la même sélectivité peuvent séparer différemment les mêmes produits (largeurs des pics ≠)

Sélectivité = paramètre très important qu'il faut ajuster au début de l'optimisation d'une méthode

Elle dépend
En CLHP : du couple φs/φm
En CPG : de la φs et de T° du four, φm a un rôle passif
Elle ne dpd pas de la granulométrie ni du débit de la φm

4.3 Nombre de plateaux théoriques N à Efficacité (largeurs des pics)

mesure de la dispersion des pics
colonne efficace si pics étroits
nbre de plateaux théoriques
N varie en fct° de la méthode N=16(Tr/ω)² =5.54(Tr/δ)

ω=largeur du pic à la base, obtenue par extrapolation des tangentes aux points d'inflexion
δ=largeur du pic à mi-hauteur
→+ un pic est étroit ,+ ω et δ sont faibles ,+ le nbre de plateau théorique N est important

Ø N dépend :

- de la longueur de la colonne
- de la granulométrie à plus les grains sont petits, + la perte de charge est impt
- de l'épaisseur du film de φs

→film sur paroi ou sur support

→si film épais ,le partage est + lent , les échanges sont + lents ,les pics sont + larges

- de la T° (CPG) et de la viscosité du solvant (CLHP)
- du débit de gaz vecteur (voir de la courbe de Van Deemter
- du type de composé

4.4 Résolution

Rs=

Mesure de la

2(Tr2-Tr1)/(ω1+ω2) = 1.18 (Tr2-Tr1)/(δ1+δ2) = 1/4 [α -1/α][K'2/(1+K'2)]x √ N2

Rs doit être >1,5 pour que 2 cp soit séparés.

qualité de la séparation

$$R = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_B}{1+k'_B}\right)\sqrt{N_B}$$

4.5 Facteur d'asymétrie

As=Y/X ou facteur de traînée

On mesure à 10% du pic le rapport des distances Y/X

A 0.05% on mesure As=

Qd mesure parfaite ω/2f

ω=2f →As=1

5 Facteurs affectant la rétention

En CPG

En CLHP : un composé est retenu qd interaction à φs

La rétention dépend : interaction soluté / φs ; soluté / φm ; φs/φm

: polarité , T° , débit

5.1 Polarité

=capacité de donner ≠tes actions =résultante de ≠tes interactions

Interactions :

- *Forces coulombiennes* : interactions électrostatiques qui interviennent pour force ionisées atomes ou ion chargé qui attire une autre m*
- *Interaction entre dipôle permanent et dipôle induit* → induit formation d'un dipôle
- *Force de dispersion ou de London* : présentes ds ttes les m*

attraction entre 2 dipôles instantanée ds ttes les m*

∃ mvmts des e- autour du noyau → responsable des interactions hydrophobes (apolaires)

énergies des liaisons

	Kj/mol
dispersion	5 à
dipôle permanent /dipôle induit	20
dipôle permanent/dipôle permanent (H)	8 à 25
liaisons ioniques	25 à 40
ces forces sont très solides	250 à 1050

une m* polaire attire tjrs 1 m* polaire ,

une m* apolaire attire une m* polaire ou moyennement polaire

important : une polarité idq peut faire intervenir des forces d'interaction ≠tes → possibilité de séparation

5.2 Température

Affecte les équilibres Kd est fct° de T°

Rôle + important en CPG qu'en CLHP

Si T° ↑ ,Tr ↓

5.3 Débit (P°)

Tr ↓ qd débit ↑

6 Optimisation en chromatographie

Optimiser =avoir la résolution que l'on souhaite avec un tps min d'analyse
Rs=

La résolution est 1/4 [α-1/α][K'2/(1+K'2)]x √ N2

- 2 α (sélectivité)
  : le plateau le + retenu

→ il faut une sélectivité min pour qu'il y ait résolution

- N2 (largeur des pics)

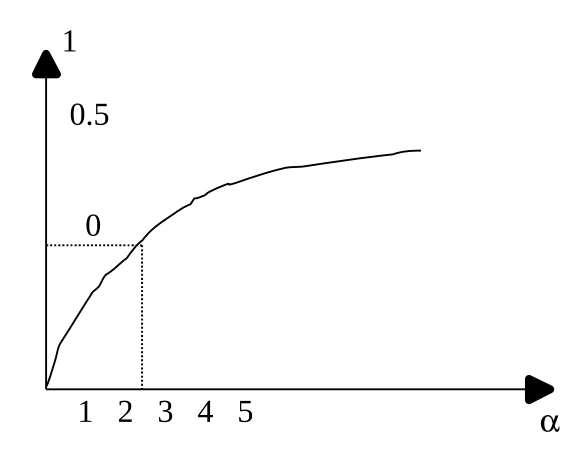
6.1 Influence de α sur Rs (K' et N cte)

α=K'2/K'1 variation de Rs avec α-1/α

1.1	0
1.2	0.09
1.	0.16
25	0.33
2.4	0.50
3.0	0.58
4.0	0.66
5.0	0.75
6.0	0.80
var Rs	0.83

(x3.5)

variation bcp – gde

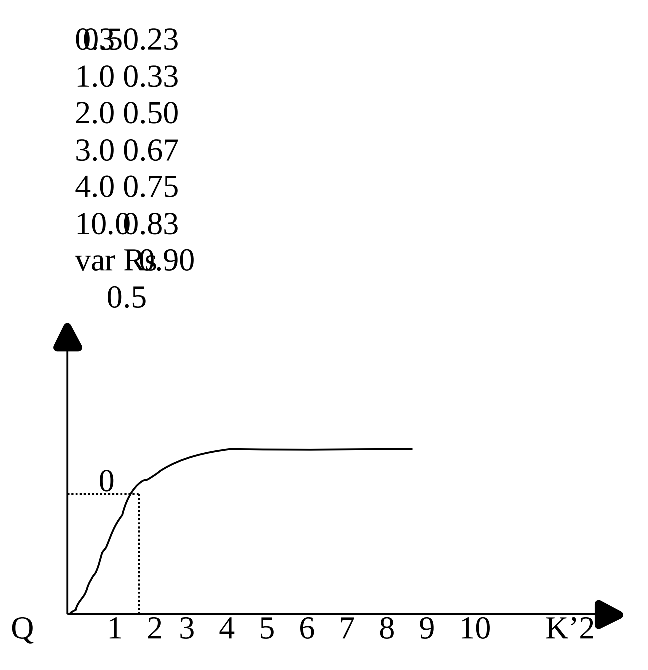


α est un paramètre très important qu'il faut ajuster au début de l'optimisation d'une méthode

6.2 Influence de K' sur Rs (avec α et N cte)

K'2 variation de Rs avec K'2 /(1+K'2)

0.1	0
0.2	0.09
	0.16



d K'2 dble au début Rs ↑ moins rapidement qu'avec α

6.3 Influence de N sur Rs (avec α et K' cte)

Si la longueur de la colonne est x2 Rs varie avec √N2

→N=x2 ,Rs= x1.4 (√ 2) ,tandis que Tr=x2

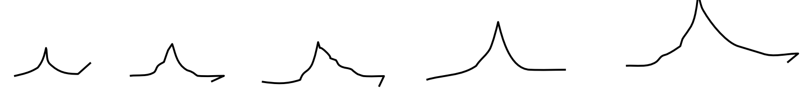
7 Analyse quantitative (+exo)

Comparaison

aires (ou hauteurs) des pics de l'ech inconnu / gamme étalon de l'analyte

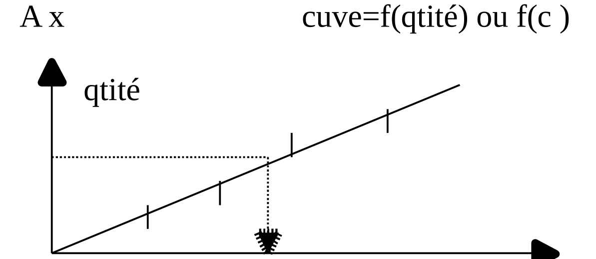
7.1 Etalonnage externe

Gamme d'étalonnage (5 conc min)
5 injections successives



mesure cuve de l'analyte

trace dte d'étalonnage
A x cuve=f(qtité) ou f(c)

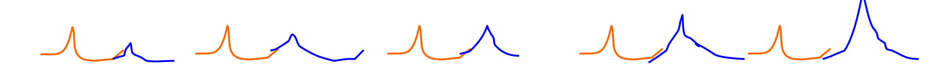


qtit
mesure (c) de l'aire analyte ds l'ech

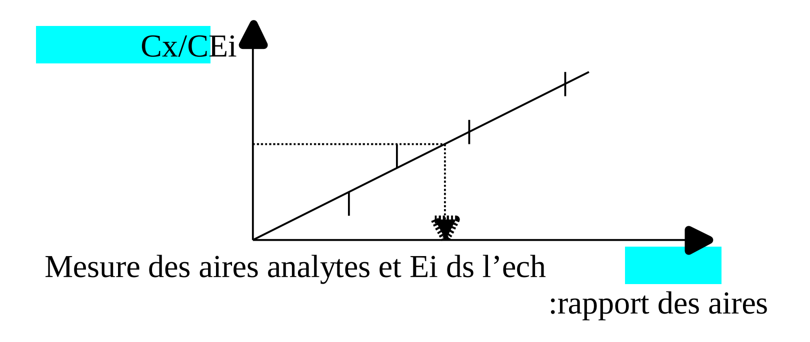
satisfaisant si volume injecté très répétable ,sinon étalonnage interne

7.2 Etalonnage interne

mesure des aires analytes et Ei ds étalon



calcul du rapport des aires analyte/Ei ;
tracé de la d
Aire x/aire Ei



Mesure des aires analytes et Ei ds l'ech
:rapport des aires

permet de s'affranchir des variations de volumes injectés (de 1 à 5 µL)
vs CLHP 20 µl
en électrophorèse capillaire ,les volumes injectés sont de 2 à 20 µL

ut en

CLHP qd travaille avec matrice complexe

permet aussi de tenir compte des pertes à l'extraction ds les ech complexes à analyser

que l'analyte. e un prod de la même famille chimique

7.3 Méthodes des ajouts dosés

NB (voir spectro UV)

___ : analyse qualitative via le tr pour les échantillons simples (sinon via détecteur UV, SM…)

8 Domaines d'applications

- **CPG** :
  - applicable aux substances volatiles ou volatilisables par élévation de T°
  - non applicable aux substances ioniques ou de MM>300 car non volatiles
  - non applicable aux substances thermolabiles
  - mais existence d'un détecteur universel de fble coût (ionisation de flamme)

- **CLHP** :
  - ts types de substances (ioniques ou non ,thermolabiles ou non PM)
  - cdt° minimun : composé soluble ds PM
  - manque détecteur universel de fble coût (∃ spectromètre de masse mais coûteux)